



厦门安提海拉生物科技有限公司  
XIAMEN Anti-hela Biological Technology Trade Co. Ltd.

## qPCR 实验报告

## 1. 实验材料描述

### 1.1 主要试剂

试剂名称	试剂来源	cat.No
RNA isolater Total RNA Extraction Reagent	南京诺唯赞生物	R401-01
HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit	南京诺唯赞生物	R212-01
ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix	南京诺唯赞生物	Q431-02

### 1.2 主检测指标:

E6、E7、

## 2. 实验步骤

### 1. RNA 提取

#### 1) 细胞收样

- a) 每孔细胞加入1ml RNA isolater, 使之充分覆盖到细胞表面, 然后用移液器将细胞吹打下来。
- b) 将裂解液转移至1.5ml离心管中, 用移液器反复吹打直至无明显颗粒样存在。冰上静置5分钟。

#### 2) RNA 提取

- a) 向裂解液中加入 1/5 体积的氯仿。盖紧离心管盖, 用手剧烈震荡 15 秒, 成乳浊液, 4°C静置 5 分钟。
- b) 12, 000g 4°C离心 15 分钟。注意此步必须是低温离心, 否则产物会有少量基因组污染。
- c) 小心取出离心管。此时溶液分为三层: 无色的上层、白色中间层以及红色的下层。小心吸取上层水相至一个新的离心管中。
- d) 加入等体积的异丙醇, 上下颠倒混匀。-20°C放置 30 分钟。
- e) 12, 000g, 4 °C离心 10 分钟。通常可以看到白色沉淀。
- f) 小心弃去上清, 加入 1ml 用 DEPC 水配置的 75%乙醇。充分洗涤管盖和管壁, 并轻弹管底, 让沉淀悬浮起来, 并静置 3-5 分钟。
- g) 12, 000g, 4°C离心 5 分钟, 弃去上清。
- h) 在洁净的环境中室温敞口干燥沉淀 2-5 分钟。注意不可过分干燥, 否则会导致 RNA 难以溶解。
- i) 加入适量的 DEPC 水溶解沉淀, 必要时可用移液器轻轻吹打几下。待完全溶解后取少量检测 RNA 浓度及完整性, 其余在-80°C保存。

RNA 浓度: 145.3ng/ul

## 2. RNA 逆转录

### 1) 基因组 DNA 去除

在RNase-free的离心管中配置如下混合液

RNase free ddH <sub>2</sub> O	to 16 μl
4 x gDNA wiper Mix	4 μl
模板RNA	Total RNA:1 pg-1 μg

用移液器轻轻吹打混匀，42℃ 2min。

### 2) 配置逆转录反应体系

在第1步的反应管中直接加入5 x HiScript II qRT SuperMix II

5 x HiScript II qRT SuperMix II	4 μl
第1步的反应液	16 μl

用移液器轻轻吹打混匀。

### 3) 进行逆转录反应

25℃	10min
50℃	30min
85℃	5min

产物可立即用于PCR反应，或在-20℃保存，并在半年内使用；长期保存建议分装后在-80℃保存。cDNA应避免反复冻融。

## 3. Real time qPCR 检测

### 1) qPCR 引物

E6-QF	TTAGAACAGCAATACAACAA
E6-QR	GCAACAAGACATACATCG
E7-QF	ACAGAGCCCATTACAATA
E7-QR	CATTAACAGGTCTTCCAA

### 2) 混合液配制

2 × ChamQ SYBR qPCR Master Mix	10.0 μl
Primer1 (10 μM)	0.4 μl
Primer2 (10 μM)	0.4 μl
50 × ROX Reference Dye 1	0.4 μl
Template DNA/cDNA	x μl
ddH <sub>2</sub> O	To 20.0 μl

### 3) qPCR 反应条件

Stage 1	预变性*1	Reps: 1	95 °C	30 sec
Stage 2	循环反应*2	Reps: 40	95 °C	10 sec
			60 °C	30 sec
			95 °C	15 sec

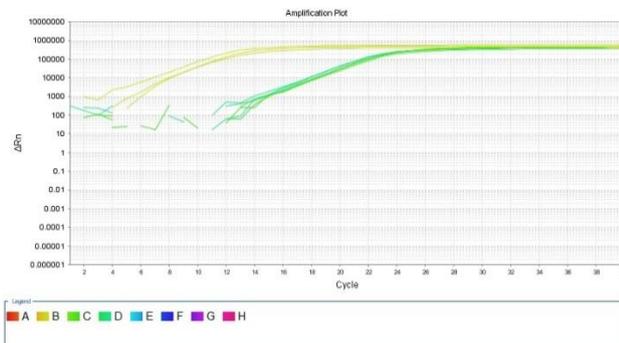
Stage 3 融解曲线\*3 Repts: 1 60 °C 60 sec  
95 °C 15 sec

3. 实验结果:

CT 值:

Sample Name	Target Name	Ct
TC-1	18S	10.89536476
TC-1	18S	10.93581486
TC-1	18S	9.944473267
TC-1	HPV16- E6	21.89325714
TC-1	HPV16- E6	21.63898468
TC-1	HPV16- E6	21.43755531
TC-1	HPV16- E7	20.95279312
TC-1	HPV16- E7	20.87046814
TC-1	HPV16- E7	20.93657494

扩增曲线:



融解曲线:

